

Untersuchungen
über die Farbstoffbildung von
Penicillium funiculosum Thom

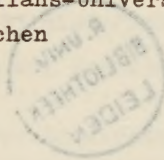
von

AUGUST BOCK

1961

Untersuchungen über die Farbstoffbildung von
Penicillium funiculosum Thom

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



eingereicht
von
August Böck
aus
Kaltenberg

23. August 1961



1. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Brauner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Merxmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 11. 1961

22.

I n h a l t s - V e r z e i c h n i s

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	2
III. Von <i>Penicillium funiculosum</i> ausgeschiedene Farbstoffe	5
IV. Abhängigkeit der Farbstoffbildung von verschiedenen Faktoren	11
a) Temperatur	11
b) pH der Nährlösung	12
c) Phosphatgehalt der Nährlösung	13
d) Kohlenstoffquellen	15
e) Stickstoffquellen	18
f) Licht	22
g) Farbstoffbildung in Stickstoffatmosphäre	23
h) Wirkung der Pigmente auf die Atmung von <i>Penicillium funiculosum</i>	23
i) Farbstoffbildung unter Einwirkung von Atmungsgiften	24
V. Farbstoffbildung unter dem Einfluß anderer Mikroorganismen	27
VI. Farbstoffbildung bei anderen <i>Penicillium</i> arten ...	30
VII. Diskussion	32
VIII. Zusammenfassung	35
IX. Literaturverzeichnis	36



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Ein systematisches Merkmal von großer Wichtigkeit stellt bei der Gattung *Penicillium* die Farbstoffbildung dar. Bei den meisten der hier auftretenden Pigmente, deren Struktur bisher aufgeklärt wurde, handelt es sich um Chinone. Zusammenhängende Referate über deren Konfiguration finden sich bei Raistrick (1940) und Birkinshaw (1953 und 1959).

Entgegen einer früheren Annahme, daß die ausgeschiedenen Pigmente für den Organismus nicht mehr verwertbare Stoffwechselprodukte seien, schreibt man heute vielen Pilzfarbstoffen eine besondere Aufgabe zu. Teilweise haben sie antibiotische Eigenschaften, sollen also eine Schutzfunktion erfüllen. So wirkt z. B. das von Arnstein, Cook und Lacey 1946 isolierte Javanicin, ein Stoffwechselprodukt von *Fusarium javanicum*, hemmend auf das Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* und *Staphylococcus aureus* (Tirunarayanan und Sirsi 1958).

viele Chinone werden im Organismus von ihrer reduzierten Stufe, den Chinolen, begleitet. Raistrick (1940) nimmt deshalb an, daß die beiden leicht ineinander übergehenden Verbindungen eine oxydativ-reduktive Aufgabe im Stoffwechsel erfüllen. So fand Friedheim (1933), daß Phoenicin, ein Produkt von *Penicillium phoeniceum*, das auch von *Penicillium rubrum* gebildet wird, katalysierend auf die Atmung anderer Mikroorganismen wirkt. (Die Atmung von *Bacillus pyocyaneus* wird durch geringe Mengen Phoenicin um 200 - 300 % gesteigert.) Mull und Nord (1944) beobachteten, daß Rubrofusarin die Oxydation von Isopropanol zu Aceton durch *Fusarium lini* Bolley beschleunigt; Radicinin, ein Produkt von *Stemphylium radicinum* zeigt den gleichen Effekt (Clarke und Nord 1955).

In verschiedenen Arbeiten, die die Farbstoffbildung von *Penicillien* behandeln (Friedheim 1938; Posternak 1938 u. 1940; Anslow u. Raistrick 1938; Hind 1940; Howard u. Raistrick 1949, 1950, 1954; Raistrick u. Ziffer 1951; Stodola, Raper u. Fenell 1951; Galarraga, Neill u. Raistrick 1955; Roberts u. Warren 1955; Neill u. Raistrick 1956), wurde zum großen

Teil nur auf den Chemismus des produzierten Farbstoffs eingegangen, die Physiologie der Pigmentbildung wurde jedoch nur in wenigen Fällen berücksichtigt (Brenner 1918; Friedheim 1932; Ebeling 1938; Virtanen 1949; Curtin, Fitzgerald u. Reilly 1940; Riedhart u. Porter 1956; Krause u. Ellis 1937; Gatenbeck 1960; Hayashi, Kikuchi u. Okamoto 1959).

Auch die Farbstoffbildung von *Penicillium funiculosum* ist nur wenig untersucht worden. Ebeling (1938) ging lediglich auf die Abhängigkeit der Pigmentbildung vom Licht ein.

Es soll deshalb Aufgabe dieser Arbeit sein, neben einer Charakteristik der chemischen Eigenschaften des Farbstoffs vor allem die Abhängigkeit der Pigmentbildung von verschiedenen Außenfaktoren herauszustellen und auf die Bedeutung der Farbstoffabgabe für den Pilz selbst einzugehen.

II. Material und Methodik

Da die Untersuchungen an einem frisch isolierten Stamm von *Penicillium funiculosum* durchgeführt wurden, sei eine kurze systematische Beschreibung des Pilzes vorangestellt. Die Bestimmung selbst erfolgte nach Thom (1930), Raper, Thom und Fenell (1949), nach Abe (1956) und nach Sakaguchi und Abe (1957).

Beim Kultivieren auf Czapek Agar beträgt der Kulturdurchmesser 10 Tage nach dem Beimpfen bei 21° C 52 - 60 mm, bei 37° C 13 - 30 mm. Die Kolonienoberfläche ist im Zentrum glatt, entspricht also nicht der für *Penicillium funiculosum* angegebenen "funiculosen" Struktur. Diese tritt nur am Kolonienrande und in älteren Kulturen (speziell auf Bierwürze-Agar) als nachträglicher Überwuchs deutlich hervor. Die Farbe der Kulturrückseite ist im Zentrum durch die hohe Konzentration des roten Pigments fast schwarz und geht nach außen zu in purpurrot über; nur wenig Farbstoff diffundiert dabei ins Substrat.

Auf Agar nach Sakaguchi und Wang erreichen die Kulturen in 10 Tagen nur einen Durchmesser von 5 - 10 mm. Es findet fast keine Sporenbildung statt, und sowohl Mycel als auch Substrat bleiben ungefärbt.

Die Konidienträger unseres Pilzes sind typisch biverticillat und symmetrisch. Sie bestehen aus einem einzigen endständigen Wirtel von Metulen, die jedoch genau so wie die Sterigmen nicht so parallel verlaufen, wie es für *Penicillium funiculosum* charakteristisch ist. Die Konidien sind elliptisch, mit glatten Wänden, ihr Durchmesser beträgt in der langen Achse 3 - 4 μ , in der kurzen Achse 2 - 2,5 μ .

Trotz der Abweichungen handelt es sich bei dem isolierten Organismus um *Penicillium funiculosum*. Eine Nachbestimmung durch das Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, bestätigte dieses Ergebnis.

Nährböden für die Bestimmung:

Czapek Agar: 3,0 g NaNO_3 , 1,0 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl , 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 30 g Rohrzucker, 15 g Agar, 1000 ml H_2O .

Agar nach Sakaguchi & Wang: Die gleiche Zusammensetzung wie Czapek Agar, jedoch werden statt 3,0 g NaNO_3 1,5 g NaNO_2 zugesetzt. Der pH wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt.

Die in Teil V und VI dieser Arbeit getesteten Mikroorganismen stammen aus der Sammlung des Botanischen Instituts der Universität München. Die Kulturen von *Penicillium rubrum* und *Penicillium purpurogenum* lieferte CBS Baarn.

Sämtliche Reihenversuche wurden in 100 ml Erlenmeyerkölbchen durchgeführt, die mit 40 ml Substrat beschickt waren. Soweit nicht anders angegeben, enthielt die Nährlösung 0,5 % Glukose und 0,4 % Asparagin. Die Konzentrationen der Lösungen sind in Gewichtsprozenten angegeben. Der pH-Wert der Nährlösungen lag normalerweise bei 4,9 - 5,0. Sterilisiert wurde die Nährlösung im Autoklaven 25 min bei 115 - 120° C. Bebrütet wurden die Kulturen bei 20 - 23° C auf einer Schüttelmaschine in der Dunkelkammer. Die Menge des gebildeten roten Farbstoffs wurde stets durch Messung des Absorptionsmaximums in einem Beckman Spektralphotometer Modell B bestimmt. Da bei vielen Versuchen die Menge des Trockengewichts (= TG) unter 2 - 3 mg lag, wurde als genauere Bezugsgröße für die Farbstoffbildung der Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl (= N) verwendet (Semimikroverfahren).

Phosphatbestimmungen wurden nach dem Verfahren von Martland und Robison (1926) durchgeführt: Nach Aufschluß mit 1 ml 30 %iger Schwefelsäure wurden 1 ml einer 10 %igen Ammonmolybdatlösung und 1 ml einer Lösung von 20 g wasserfreiem Natriummetabisulfit und 0,5 g Hydrochinon in 100 ml Wasser zugegeben und auf 15 ml aufgefüllt. Die nach 30 min stabile Blaufärbung wurde bei 587 $m\mu$ gemessen und an Hand einer Eichkurve ausgewertet.

Atmungsmessungen wurden nach der Methode von Warburg bei 27° C durchgeführt.

Um einen Überblick über die Variationsbreite des Materials zu erhalten, wurden 12 Kölbchen gleicher Nährlösung (jeweils 0,5 % Glukose und 0,4 % Asparagin) mit Sporen beimpft und drei Wochen bebrütet. Das Ergebnis des Versuchs zeigt Tabelle 1.

	Gesamtstickstoff [g]	Gesamtfarbst. bei Ext. 500 $m\mu$	Ext/10g N
Arithmetischer Mittelwert	68,5	645	95,3
Streuung	$\pm 16,7$	$\pm 14,7$	$\pm 10,4$
Streuung in % des Mittelwertes	24,4	22,8	10,9

Tab. 1: Mittelwerte und Streuung der Farbstoff- und Stickstoffmengen und des Quotienten Farbstoff/Stickstoff aus 12 gleichen Versuchsansätzen.

Wegen des ungleichmäßigen Wachstums in den einzelnen Proben ist die Streuung für den Stickstoffgehalt und den Gesamtfarbstoff relativ hoch; geringer ist sie für den Quotienten Farbstoff : Stickstoff. Es zeigte sich, daß die Streuung mit längerer Versuchsdauer kleiner wird. Um einigermaßen konstante Werte zu erhalten, war deshalb eine Versuchszeit von mindestens drei Wochen erforderlich.

III. Von Penicillium funiculosum ausgeschiedene Farbstoffe

Wird *Penicillium funiculosum* auf einem flüssigen Medium kultiviert, das Glukose und Nitrat enthält, dann scheidet es einen gelben bis orangen Farbstoff ab, der sich mit Äther aus der Nährlösung extrahieren läßt. Zur Reinigung des Farbstoffs wird die Ätherphase dann solange mit destilliertem Wasser ausgewaschen, bis weder papierchromatographisch Glucose noch mit Diphenylamin Nitrat mehr nachweisbar sind. Durch Abdampfen des Äthers im Vakuum und anschließendes Trocknen des Rückstandes konnte der gelbe Farbstoff als braunschwarzes amorphes Produkt erhalten werden. Es löst sich sehr gut in Aceton, Chloroform, Äthanol, Methanol und Äthylacetat, weniger gut in Benzol, Wasser, Schwefelkohlenstoff und Tetrachlorkohlenstoff und ist vollkommen unlöslich in Petroläther. Mikroschmelzpunktbestimmung an mehreren Präparaten ergab - wahrscheinlich infolge unterschiedlichen Reinheitsgrades - Werte zwischen 72° und 105° C.

Das gelbe Pigment gibt folgende Reaktionen: Setzt man zu seiner alkoholischen Lösung einen Tropfen konz. KOH zu, so entsteht eine purpurrote Farbe, die beim Einleiten von Sauerstoff nicht verschwindet. Zusatz einer wässerigen Lösung von FeCl_3 zu einer äthanolischen Lösung des Pigments bewirkt Farbumschlag nach braun.

Das Absorptionsspektrum des gelben Pigments besitzt im Bereich des sichtbaren Lichtes ein einziges Maximum, dessen Lage in wässriger Lösung sehr stark vom pH-Wert abhängig ist. Es liegt bei einem pH von 5,0 zwischen $483 - 485 \text{ m}\mu$. In wassergesättigtem Äther absorbiert das Pigment dagegen am stärksten zwischen $443 - 445 \text{ m}\mu$.

Trotz aller Bemühungen gelang es nicht, den Farbstoff zu kristallisieren. Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung nach Rast und der Mikroelementaranalyse des amorphen Produkts kann man deshalb nur als Annäherungswerte betrachten. Die Molekulargewichtsbestimmung ergab Werte zwischen 262 und 280, die Elementaranalyse einen prozentualen Gehalt der Substanz von 60,40 % C

und 6,41 % H. Der gelbe Farbstoff enthält keinen Stickstoff. Aus den obigen Werten ergibt sich eine Summenformel von $C_{15}H_{19}O_6$ entsprechend einem Molekulargewicht von 295. Die Unschärfe des Schmelzpunktes und der zu geringe Wert des bestimmten Molekulargewichts sprechen dafür, daß das analysierte Präparat verunreinigt war. Es kann deshalb nicht entschieden werden, ob der isolierte Farbstoff mit dem von Igarasi (1939) analysierten Funiculosin, oder mit dem von Abe (1956) aufgeführten Helenin - beides Pigmente von *Penicillium funiculosum* - identisch ist, oder ob es sich um eine neue Verbindung handelt.

Wird eine Glycin und Glukose enthaltende Nährlösung mit *Penicillium funiculosum* beimpft, dann beobachtet man neben einer geringen Menge gelben Pigments das Auftreten eines intensiv roten Farbstoffs. Dieser läßt sich bei einem pH-Wert unter 3 leicht ausäthern. Zur Reinigung wird der Äther dann mit stark verdünnter HCl gewaschen, auf ein kleines Volumen eingeeengt und daraus das Pigment durch Zusatz von Petroläther ausgefällt. Dieser Prozeß wird sooft wiederholt, bis papierchromatographisch weder Glukose noch Glycin mehr nachgewiesen werden können. Der so gereinigte rote Farbstoff löst sich leicht in verdünnter NaOH, in Natriumbikarbonatlösung, Aceton, Äthanol, Methanol, Isopropanol, Pyridin, Äthylacetat und Eisessig, er ist schwer löslich in verdünnten Mineralsäuren, Chloroform und Amylacetat und vollkommen unlöslich in Benzol, Tetrachlorkohlenstoff, Schwefelkohlenstoff, Spezialbenzin, Hexan und Petroläther. Aus der Löslichkeit des Farbstoffes in $NaHCO_3$ und der Möglichkeit, ihn im saurem pH-Bereich auszuäthern, läßt sich auf das Vorhandensein von Carboxylgruppen schließen.

Im Gegensatz zum gelben Pigment besitzt der rote Farbstoff ein Absorptionsspektrum mit zwei deutlich ausgeprägten Maxima im Bereich des sichtbaren Lichts. Sie liegen in einer Natriumbikarbonatlösung bei 415 und 505 $m\mu$, in n/10 NaOH tritt nur ein einziges sehr steiles Maximum bei 485 $m\mu$ auf (siehe Abb. 1), das wahrscheinlich kennzeichnend für das Natriumsalz des roten Pigments ist.

Der rote Farbstoff wird nur - worauf noch näher einzugehen ist -

in Gegenwart von Aminosäuren gebildet. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß er auch Aminosäuren als Bausteine enthält. Um dies zu prüfen, wurde rotes Pigment mittels Kationenaustauscher Dowex 50 von Aminosäuren befreit und drei Stunden lang mit 6 n Salzsäure hydrolysiert.

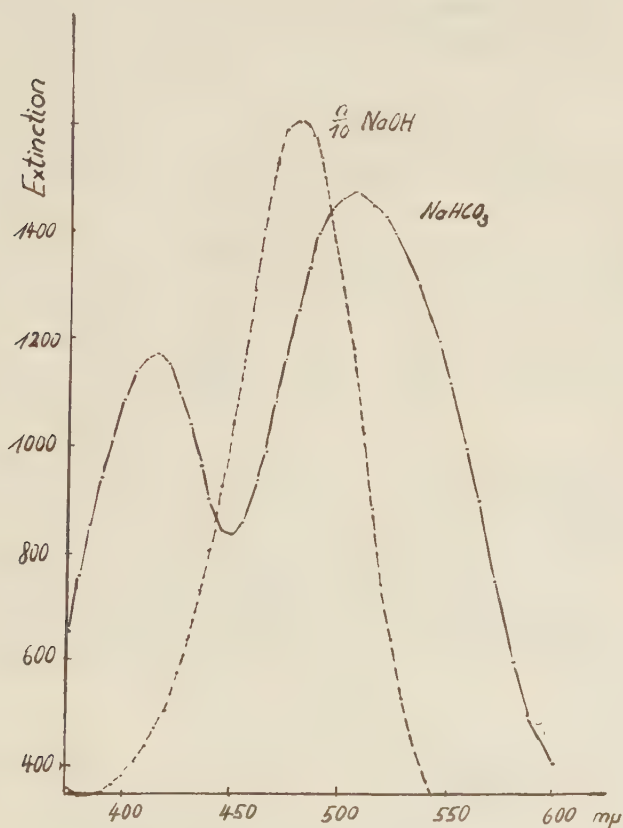


Abb. 1: Absorptionsspektren des roten Farbstoffs in n/10 NaOH und in Natriumbikarbonatlösung

Das Hydrolysat wurde absteigend zweidimensional chromatographiert (Laufmittel waren Isopropanol : Wasser : Eisessig = 70 : 20 : 10 und α -Picolin : Wasser : Ammoniak = 70 : 28 : 2)

und durch Besprühen mit Ninhydrin auf Aminosäuren untersucht. Im Hydrolysat konnten im Gegensatz zum unbehandelten roten Farbstoff Aminosäuren nachgewiesen werden, so daß sie als Komponenten des Farbstoffmoleküls angenommen werden müssen. Wurde das Pigment dadurch gewonnen, daß man *Penicillium funiculosum* auf Asparaginmedium kultivierte, dann trat nach der Hydrolyse hauptsächlich Asparaginsäure, in Spuren daneben Glycin und Glutaminsäure auf.

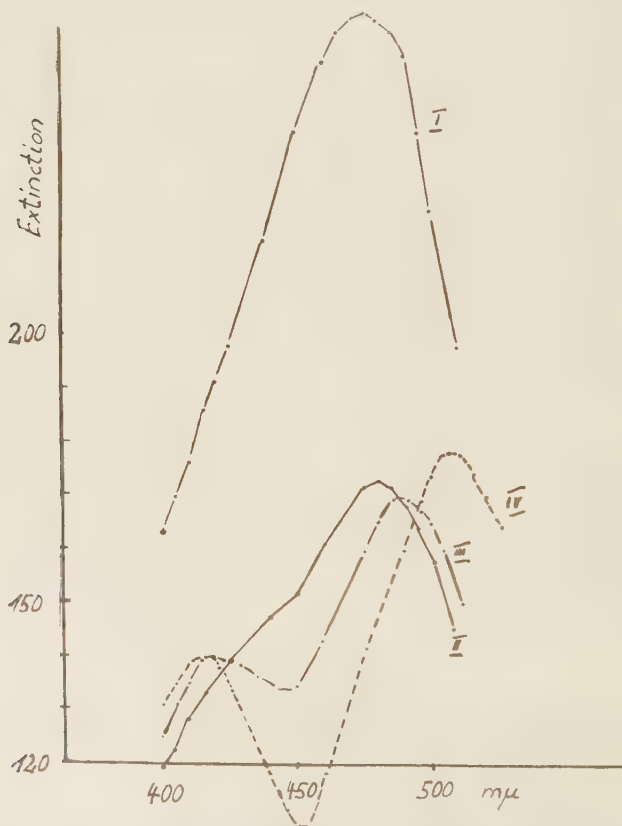


Abb. 2: Veränderungen des Spektrums nach Zugabe von 0,4 % Methionin zu einer Lösung des gelben Farbstoffs in Wasser. Kurve I zeigt das Spektrum vor der Aminosäurezugabe, II, III und IV wurden eine, 5 bzw. 24 Stunden nach dem Zusatz aufgenommen.

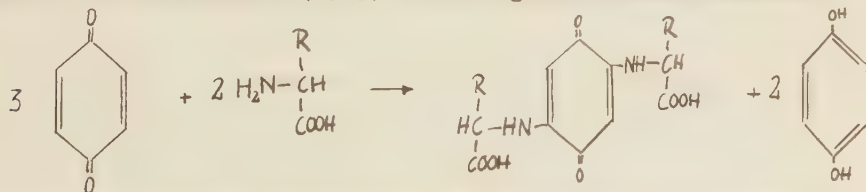
Erfolgte die Farbstoffbildung auf Glycinnährböden, dann erhielt man vor allem Glycin. Auch hier konnte in Spuren Glutaminsäure nachgewiesen werden.

Sämtliche Ansätze mit Asparagin zur Gewinnung des roten Farbstoffs ergaben neben einer großen Ausbeute von rotem Pigment eine geringe Menge gelben Farbstoffs. Letzterer verschwand jedoch nach Entfernen des Mycels im Zeitraum von 1 - 2 Tagen. Die Extinction des roten Pigments nahm in dieser Zeit dagegen zu. Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß aus dem gelben Farbstoff durch Zusatz von Aminosäure der rote entstünde.

Der Nachweis hierfür konnte durch Zugabe von 0,4 % Methionin zu einer wässerigen Lösung des gelben Pigments erbracht werden. In Abb. 2 sind die Veränderungen des Absorptionsspektrums nach Zugabe der Aminosäure in Abhängigkeit von der Reaktionszeit dargestellt. Die gelbe Farbe schlug während dieser Zeit nach rot um. Während für das Spektrum des gelben Pigments ein einziges Maximum charakteristisch ist, bilden sich nach dem Zusatz der Aminosäure zwei heraus, deren Lage mit der beim roten Farbstoff übereinstimmt.

Nach diesen Befunden verbinden sich der gelbe Farbstoff und die Aminosäure zu einem roten Komplex. Da diese Reaktion für Chinone charakteristisch ist und da chinoide Farbstoffe bei Mikroorganismen weit verbreitet sind, erscheint für das gelbe Pigment eine Chinonstruktur ebenfalls wahrscheinlich.

Komplexbildung dieser Art erfolgt nach Untersuchungen von Michalek und Szarkowska (1959) nach folgendem Reaktionsschema:



Die bei der Reaktion entstehenden zwei Moleküle Diphenol werden im Organismus durch Polyphenolasen zum Chinon zurückoxydiert und können wiederum in die Reaktion eingreifen. Aus diesem Grunde entstehen in vivo nach Michalek und Szarkowska weit größere Mengen des Chinon-Aminosäurenkomplexes als in vitro.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist sehr stark pH-abhängig. Bei Werten im Bereich von 10 bis 5 erfolgt die Reaktion der Aminosäure mit dem gelben Pigment augenblicklich, je weiter der pH-Wert jedoch unter 5,0 liegt, desto langsamer verläuft die Umsetzung. Bei pH-Werten unter 3,6 sinkt auch die Extinction des Gesamtfarbstoffs, das heißt, ein Teil des Pigments wird zerstört.

Die pH-Abhängigkeit der Umwandlungsgeschwindigkeit ist auch der Grund dafür, daß ein erheblicher Teil des abgegebenen Pigments noch in gelber Form vorliegt, wenn man *Penicillium funiculosum* auf Asparaginmedium kultiviert, da dieses einen pH von 4,0 hat. Zieht man den Pilz dagegen auf einer Glycinlösung, dann wird beinahe aller gelber Farbstoff in die rote Form umgewandelt, da in diesem Fall der pH-Wert des Nährbodens bei 5,5 liegt. Das gleiche gilt für die Farbstoffbildung in einem Nährmedium, das Methionin enthält. Zur Zeit der Aufnahme des Spektrums II der Abbildung 2 konnte durch Ausäthern kein gelber Farbstoff mehr nachgewiesen werden, obwohl die Reaktion noch nicht abgeschlossen war, wie die weitere Veränderung des Spektrums zeigt. Die Maxima sind noch sehr wenig ausgeprägt, und erst nach ca. 24 Stunden werden konstante Werte erhalten, die den Abschluß der Reaktion anzeigen.

Mit Ammonsalzen reagiert der gelbe Farbstoff ebenfalls. Auch hier tritt ein Farbumschlag nach rot ein. Da sich der gelbe Farbstoff durch Ausäthern leicht wieder vom Ammonsalz trennen läßt, scheint es sich in diesem Falle um eine lockere Anlagerungsverbindung zu handeln.

Die Lage der Absorptionsmaxima der bei Umsetzung mit verschiedenen Aminosäuren entstehenden Farbstoffe hängt stark von der Konzentration der Reaktionspartner ab. Das erste Maximum liegt jedoch stets zwischen 405 und 420 m μ , das zweite zwischen 500 und 510 m μ .

Die Bildung des roten Farbstoffs erfolgt zum großen Teil erst nach Ausscheidung des gelben Pigments, sie ist also wohl vorwiegend eine Substratreaktion. Zusätzlich verbindet sich der gelbe Farbstoff auch mit den im Mycel vorhandenen freien

Aminosäuren und wird dann als Komplex ausgeschieden. Dies geht aus der Zusammensetzung des Hydrolysats des roten Pigments, das auch Glutaminsäure enthält, obwohl als Substrat nur Asparagin gegeben wurde, deutlich hervor.

Der Extinctionswert des im Substrat vorliegenden roten Farbstoffs kann als Maß für die Menge des abgeschiedenen gelben angesehen werden. Die Messung der Gesamtpigmentmenge bei den Versuchen erfolgte deshalb durch Bestimmung der Extinction bei 500 m μ , da hier der Gesamtfarbstoff am stärksten absorbiert. Die geringe Menge des im Gleichgewicht vorliegenden gelben Pigments verschiebt nämlich das normalerweise bei 505 m μ liegende Maximum des roten nach einer kürzeren Wellenlänge.

IV. Abhängigkeit der Farbstoffbildung von verschiedenen Faktoren

a) Temperatur

Abb. 3 zeigt die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von der Temperatur. Die Wachstumsunterschiede bei verschiedener Temperatur lassen sich dadurch ausgleichen, daß man die Farbstoffmenge auf den Gesamtstickstoffgehalt bezieht.

Das Maximum der Farbstoffausbeute wird bei 37° C bereits am 7. Tag nach dem Beimpfen erreicht. Von diesem Zeitpunkt an scheidet das Mycel entweder keinen oder nur noch sehr wenig Farbstoff aus. Die Zerfallsgeschwindigkeit ist offenbar bei dieser Temperatur höher als die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung, d. h., die Intensität der Farbe nimmt ab. Bei 30° C erfolgt der Anstieg der Kurve bis zum 3. Tag zwar eben so schnell wie bei 37° C, erreicht aber am 7. Tag ein beträchtlich höheres Maximum, das dann bis zum Ende der 11tägigen Versuchszeit fast unverändert erhalten bleibt. Temperaturen unter 30° C verzögern den Beginn der Pigmentbildung, fördern jedoch nach dem 7. Tag deren Intensität. Optimale Farbstoffausbeute erhält man dabei zwischen 20 und 22° C, bei 16° C ist die Farbstoffsynthese dann bereits etwas gehemmt.

Der Grund für die rasche Bildung der maximalen Pigmentmenge bei 37° C und 30° C liegt vermutlich darin, daß der Pilz bei

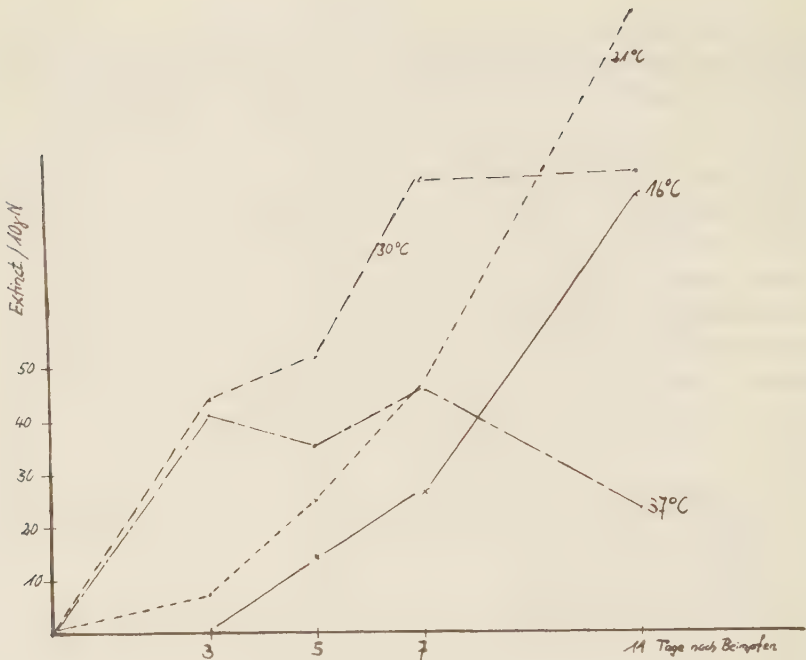


Abb. 3: Farbstoffbildung bei verschiedener Temperatur;
Substrat: 0,5 % Glukose, 0,4 % Asparagin, pH 4,7.

diesen Temperaturen früher die stationäre Phase des Wachstums und damit auch früher das Maximum der Farbstoffbildung erreicht. Im Gegensatz dazu beschleunigt die höhere Temperatur jedoch auch die Zersetzung des Farbstoffs und die Autolyse des Pilzes, was eine rasche Abnahme der Farbstoffmenge zur Folge hat. Diese beiden Vorgänge sind bei 20° C und 16° C weniger ausgeprägt. Deshalb steigt bei diesen Temperaturen die Kurve der Farbstoffbildung am 11. Tag nach dem Beimpfen noch an, während sie dann bei 30° C bereits einen konstanten Wert erreicht hat und bei 37° C sogar abfällt.

b) pH der Nährlösung

Das Wachstumsoptimum von *Penicillium funiculosum* liegt bei einem pH-Wert von 4,7 - 5,0. Der Pilz verändert die Azidität des Mediums stets in Richtung dieses Wertes.

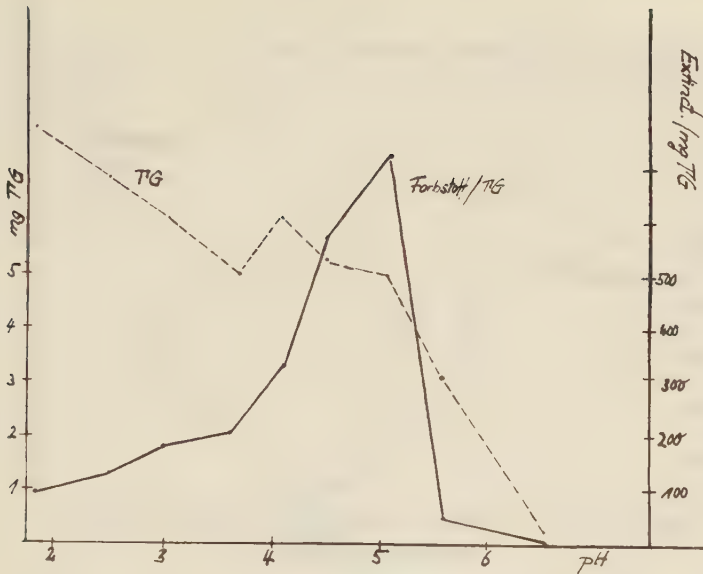


Abb. 4: Abhängigkeit der Farbstoffbildung und des Trockengewichts vom pH-Wert der Nährlösung; — = Extinction des Nährbodens bei 500 μ /mg Trockengewicht; ---- = Trockengewicht.

Um bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Farbstoffbildung eine Veränderung der eingestellten Werte möglichst einzuschränken, wurde mit einem m/40 Zitratpuffer gearbeitet. Anfangs- und End-pH der Nährlösung wichen dann nur ganz geringfügig voneinander ab. Das Versuchsergebnis zeigt Abb. 4. Die Farbstoffbildung ist eindeutig vom pH-Wert der Nährlösung abhängig. Maximale Pigmentproduktion findet zwischen pH 4,8 und 5,0 statt, also in einem Bereich, in dem in Kulturen, die nicht unter Phosphatmangel leiden, auch das Wachstumsoptimum des Pilzes liegt.

c) Phosphatgehalt der Nährlösung

Pigmentbildung tritt bei *Penicillium funiculosus* nur auf, wenn kein Phosphat zum Substrat gegeben wird. Ein geringes Wachstum wird durch den Phosphatgehalt der Sporen trotzdem ermöglicht. Aus Abb. 5 geht ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Phosphatgehalt der Nährlösung und der Menge des gebildeten Farbstoffs hervor.

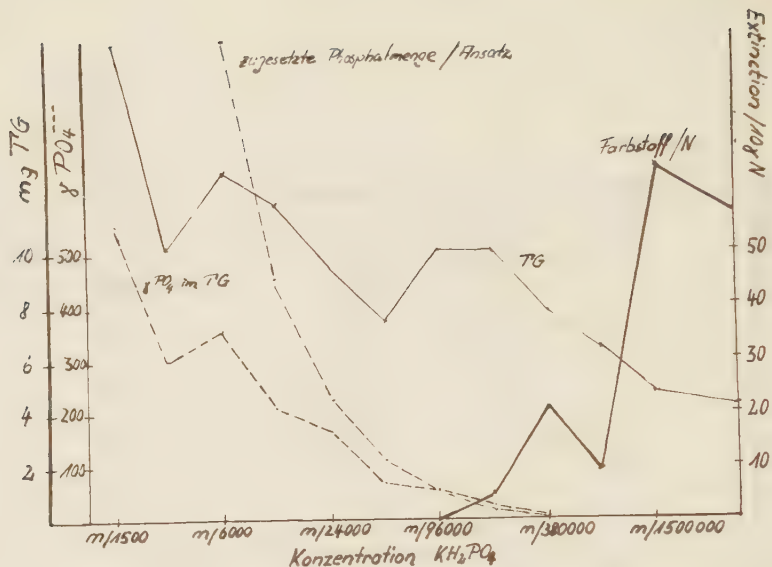


Abb. 5: Abhängigkeit der Farbstoffbildung vom Phosphatgehalt der Nährlösung; ——— = Trockengewicht; --- = Phosphatgehalt; ——— = Extraktion bei 500 $\mu\text{g}/10\text{g}$ N Pilzsubstanz; Substrat: 0,5 % Glukose, 0,4 % Asparagin, pH 4,7

Pigment wird überhaupt nur abgeschieden, wenn die Zugabe von Phosphat ganz unterbleibt oder eine Konzentration von 10^{-5} m KH_2PO_4 nicht überschreitet. Bei dieser Verdünnung ist die pro Ansatz zugesetzte Phosphatmenge aus dem Substrat ins Mycel aufgenommen, wie aus dem Vergleich der beiden Phosphatkurven der Abb. 5 hervorgeht. (Von einer Konzentration von m/380000 abwärts liegt die Phosphatmenge unter der Bestimmungsgrenze.) Die Nährlösung ist nun phosphatfrei. Gleichzeitig damit beginnt die Farbstoffbildung.

Man könnte aus diesem Zusammenhang den Schluß ziehen, daß das gelbe Pigment ein Autolyseprodukt darstellt. Um dies zu untersuchen, wurde eine Wachstumskurve des Pilzes aufgenommen und mit dem Verlauf der Farbstoffbildung verglichen (Abb. 6). Der Beginn der Pigmentausscheidung liegt in der logarithmischen Phase des Wachstums, zu einem Zeitpunkt also, zu dem das aus den Sporen stammende Phosphat noch Wachstum zuläßt, das Mycel sich demnach noch nicht zersetzt.

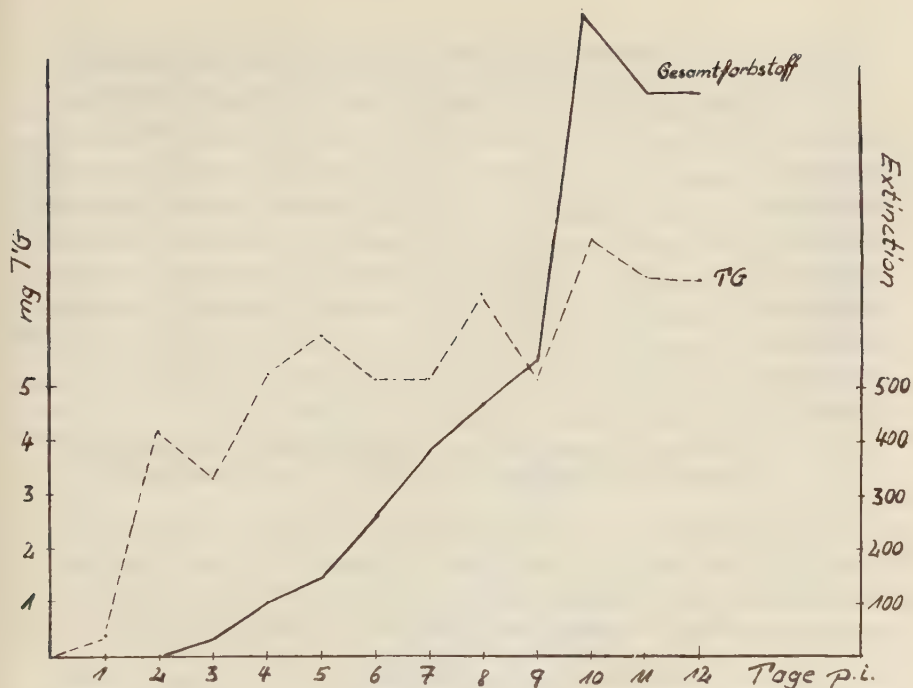


Abb. 6: Zusammenhang zwischen dem Verlauf des Wachstums und der Farbstoffbildung; Substrat: 0,5 % Glukose, 0,4 % Asparagin, pH 4,7; --- = Trockengewicht, — = Extinction des Nährbodens bei 500 mμ.

Wie daraus hervorgeht, ist die Pigmentsynthese durch *Penicillium funiculosum* kein Autolysevorgang. Das eigentliche Maximum der Farbstoffbildung wird jedoch erst in der stationären Phase des Wachstums erreicht. Gibt man nun während der stationären Phase Phosphat zur Nährlösung, so kann man eine zweite log-Phase des Wachstums hervorrufen. Die Farbstoffbildung wird in diesem Falle sofort eingestellt und das vorher erzeugte Pigment wandelt sich langsam in braune Zersetzungsprodukte um.

d) Kohlenstoffquellen

Tabelle 2 zeigt die Fähigkeit von *Penicillium funiculosum*, Kohlenhydrate ab- und einzubauen und auf diesem Substrat Farbstoff zu bilden.

0,5 %	Farbstoffbildung		Atmungssteigerung mit Phosphat in % über Leeratmung
	mit Phosphat Extinct./10% N	ohne Phosphat Extinct./10% N	
Fruktose	-	112	88
Mannose	-	123	90
Galaktose	-	117	52
Rhamnose	-	133	79
Sorbose	45	27	4
Saccharose	-	105	86
Lactose	-	2	13
Arabinose	-	95	37
Glukose		121	88

Tab. 2: Verwertung verschiedener Kohlenhydrate zur Farbstoffbildung; die Nährlösung enthielt 0,4 % Asparagin.

Aus den Messungen der Atmungsgröße geht hervor, daß bei Anwesenheit von Phosphat fast alle Kohlenhydrate verwertet werden können. Eine Ausnahme macht nur Sorbose, wobei auffallend ist, daß gerade in diesem Fall Farbstoff gebildet wird.

Wird der Pilz auf Kohlenhydratnährböden ohne Phosphat kultiviert, dann scheidet er bei Darbietung fast aller der geprüften Zuckerarten ungefähr gleich viel Pigment aus. Nur im Falle der wenig atmungssteigernden Zucker Laktose und Sorbose wird fast kein Pigment gebildet. Die Art des zugegebenen Kohlenhydrats scheint also, wenn es überhaupt verwertbar ist, nicht maßgebend für die Menge des gebildeten Farbstoffs zu sein. Entscheidend ist dagegen die Konzentration des Zuckers. Wie die Kurve der Farbstoffbildung in Abb. 7 zeigt, stellt von einer Verdünnung von 0,025 % Glukose abwärts die Kohlenhydratmenge den limitierenden Faktor für die Pigmentsynthese dar. Die Kurve sinkt von diesem Punkt an rasch ab, bleibt aber von 0,00625 % Glukose an wieder konstant. Von dieser Konzentration ab stammt die gebildete geringe Farbstoffmenge wahrscheinlich aus der Verwertung des Kohlenstoffgerüsts der zugegebenen Aminosäure (im Falle des in Abb. 7 dargestellten Versuchs Asparagin).

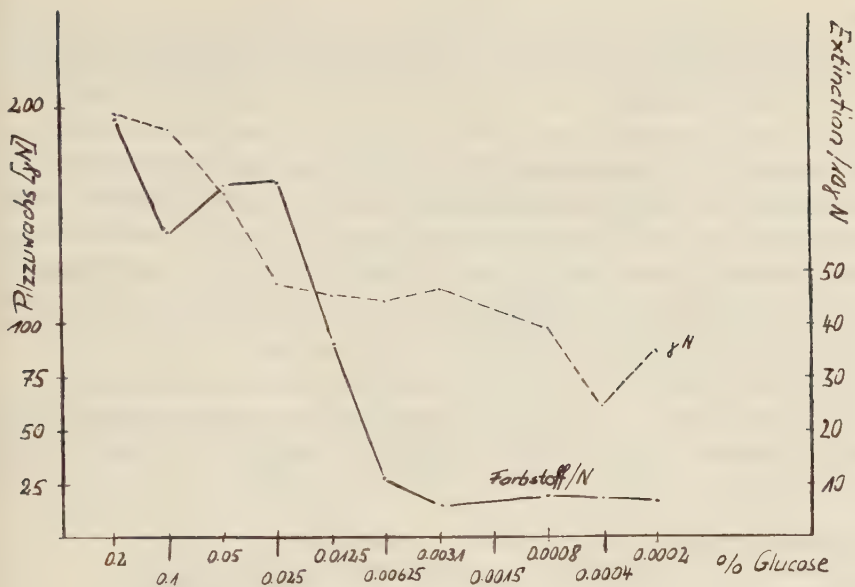


Abb. 7: Farbstoffbildung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration; Substrat: 0,4 % Asparagin, pH 4,7;
 --- = γ N Pilzzuwachs; — = Extinction des Gesamtfarbstoffs bei 500 $m\mu/10\gamma$ N.

0,5 %	Farbstoffbildung						Atmg.steig.mit Phosphat in % über Leeratmung
	mit Phosphat			ohne Phosphat			
	N [x]	Ext/10γ	N	N [γ]	Ext/10γ	N	
Ca-Laktat	472	5		38	53		52
NH ₄ -Oxalat	182	0		42	12		18
Na-Fumarat	382	10		42	76		50
Na-Malat	392	10		58	10		43
Na-Formiat	544	0		73	0		135
K-Citrat	171	3		125	24		19
Na-Acetat	354	0		211	4		110
Na-Succinat	288	4		68	8		57
Na-Tartrat	130	2		86	2		11
Glukose		0		56	101		

Tab. 3: Verwertbarkeit von Carbonsäuren zur Farbstoffbildung;
 Substrat: 0,4 % Asparagin, pH 4,7.

Weit schlechtere Substrate für die Farbstoffsynthese als Kohlenhydrate sind, wie aus Tabelle 3 hervorgeht, Carbonsäuren.

Ein weiterer Unterschied liegt darin, daß Säuren auch in Gegenwart von Phosphat meist etwas Farbstoff bilden, wenn auch weniger als ohne Phosphat.

Ein Carbonsäurezusatz zu einem Kohlenhydratsubstrat steigert allerdings die Pigmentproduktion. So betrug die auf einen Stickstoffgehalt von 10 γ bezogene Extinction bei einem Glukose-Asparaginnährboden (0,4 % Glukose) 136, stieg jedoch in Proben mit 0,4 % Succinatzusatz auf 276 an. Obwohl Succinat als alleiniger Ausgangsstoff für die Pigmentsynthese ungeeignet ist, ergab sich hier eine Steigerung um 100 %.

Von verschiedenen getesteten Alkoholen - jeweils in einer Konzentration von 1,5 % - ließen nur Äthanol und Glycerin merkliches Wachstum zu. Die Farbstoffbildung war dabei jedoch sehr gering.

e) Stickstoffquellen

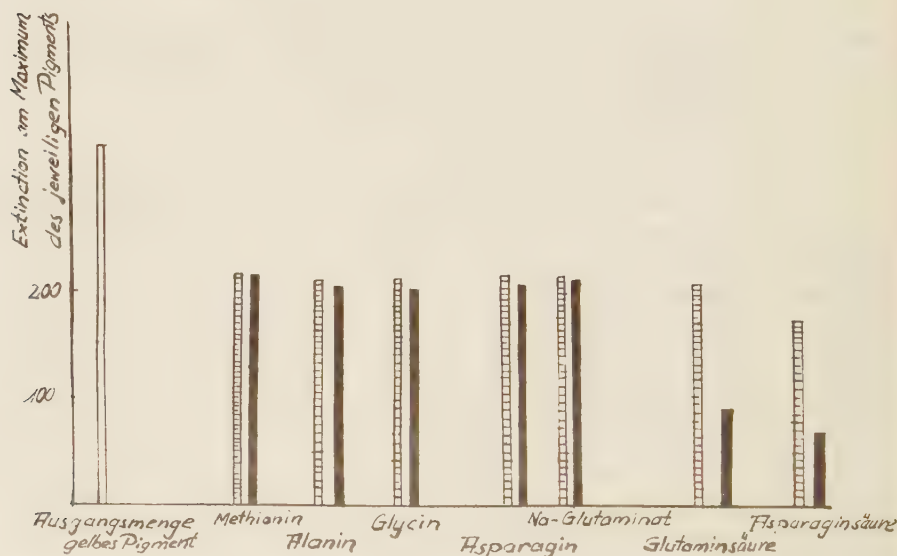


Abb. 8: Umsetzung des gelben Pigments mit verschiedenen Aminosäuren (jeweils 0,4 %); = Extinction des Gesamtfarbstoffs bei 500 m μ ; = Extinction des roten Pigments bei 505 m μ .

Betrachtet man die Umsetzung verschiedener Aminosäuren mit

einer bestimmten Menge gelben Farbstoffs in vitro, so sieht man, daß die Ausbeute an rotem Pigment nicht von der Art der Aminosäure abhängt. Ausnahmen machen nur Asparaginsäure und Glutaminsäure. Bei ihnen ist sowohl eine langsamere Umsetzung als auch eine deutliche Abnahme der Gesamtextinction zu beobachten, beides Erscheinungen, die vermutlich auf den niedrigen pH-Wert der Lösung zurückzuführen sind. Bei den anderen Aminosäuren der Abb. 8 wurde der pH-Wert jeweils auf 5,5 eingestellt.

Im Gegensatz zu den Versuchen in vitro erhält man bei Kultur von *Penicillium funiculosum* auf verschiedenen Aminosäuren die in Tabelle 4 zusammengefaßten Werte.

Na-Glutaminat	Methionin	Asparagin	Alanin	Glycin	Asparaginsäure
313	292	234	156	126	120

Tab. 4: Farbstoffbildung auf Substraten mit jeweils 0,4 % verschiedener Aminosäuren. pH der Nährlösung 5,0. Die Zahlen der Tabelle bedeuten die Extinction des Gesamtfarbstoffs bei einer Wellenlänge von 500 m μ bezogen auf den Stickstoffgehalt des Mycels.

Natriumglutaminat und Methionin fördern demnach die Farbstoffbildung besonders stark, etwas weniger Asparagin.

Neben der Art der Aminosäure hat jedoch auch deren Konzentration einen entscheidenden Einfluß auf die Menge des gebildeten Pigments. Abb. 9 zeigt einen Versuch mit Asparagin als Substrat. Bei allen Konzentrationen lag ungefähr gleich viel gelber Farbstoff im Gemisch vor. Bei einer Asparaginkonzentration von 0,0004 % kann sich daraus kein roter Farbstoff mehr bilden, da hier die gesamte Aminosäurenmenge aus dem Substrat in das Mycel aufgenommen ist. Die Farbstoffbildung nimmt jedoch mit steigender Aminosäurenkonzentration stark zu. So steigert eine Erhöhung der Asparaginmenge von 0,1 % auf 0,4 % die Pigmentausscheidung um 100 %, obwohl die Stickstoffmenge im Trockengewicht nur unwesentlich zunimmt. Von einer Konzentration von 0,8 % Asparagin an aufwärts tritt keine vermehrte Pigmentproduktion mehr ein, die Extinction sinkt sogar - wahrscheinlich infolge zu hoher Substratkonzentration - leicht ab.

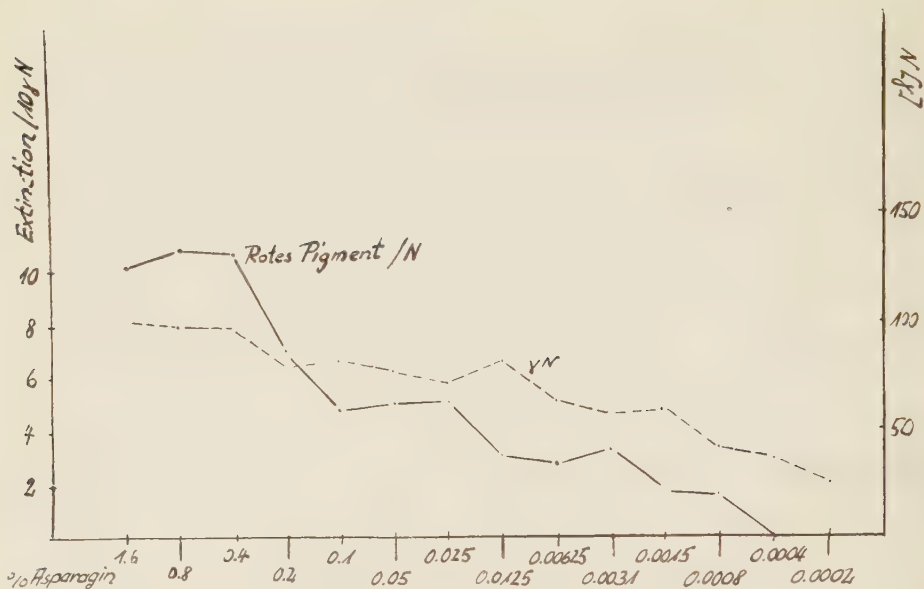


Abb. 9: Einfluß der Asparaginkonzentration auf die gebildete Farbstoffmenge; Substrat: 0,4 % Glukose, pH 4,7;
 --- = γ N Pilzzuwachs; — = Extinction des roten Farbstoffs bei $505 \text{ m}\mu/10\gamma\text{N}$.

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 10 die Reaktion verschiedener Glycinkonzentrationen mit gelben Farbstoff in vitro.

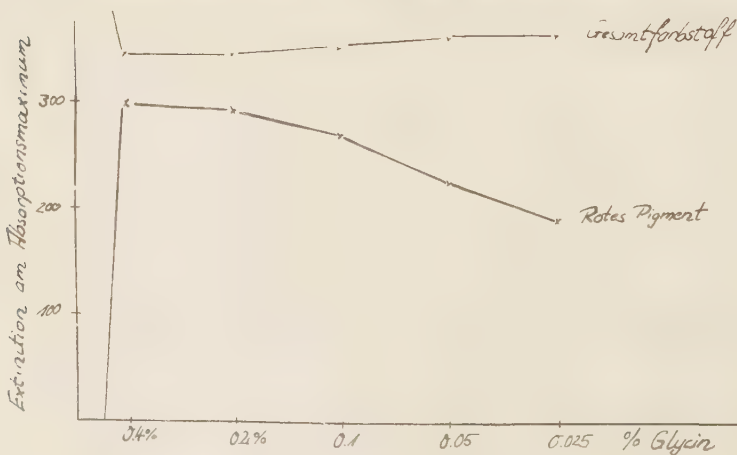


Abb. 10: Umwandlung des gelben Pigments in das rote in Abhängigkeit von der Glycinkonzentration; Reaktionszeit 72 Std.

Die niedrigere Ausbeute an rotem Farbstoff bei einer Glycinkonzentration von 0,025 - 0,01 % hat ihre Ursache nicht darin, daß zu wenig Aminosäure als Reaktionspartner vorhanden ist. Es genügen nämlich bereits 0,025 % Asparagin (Abb. 9) - das gleiche gilt auch für Glycin - um weit größere Farbstoffmengen zu erzeugen. Das Absinken der Kurve der Abb. 10 ist vielmehr auf die geringere Reaktionsgeschwindigkeit bei niedriger Aminosäurekonzentration zurückzuführen.

Abb. 11 zeigt die Absorptionsspektren der nach Abb. 10 entstandenen Gesamtfarbstoffe. Die Unterschiede im 2. Maximum sind auf die verschiedenen Mengen des im Gleichgewicht vorliegenden gelben Pigments zurückzuführen, das sowohl eine Überhöhung des Maximums bewirkt als auch dieses nach einer kürzeren Wellenlänge verlegt. Vergleicht man das erste Maximum mit dem der Abb. 2, so kann man erkennen, daß die beiden die gleiche Abhängigkeit aufweisen.

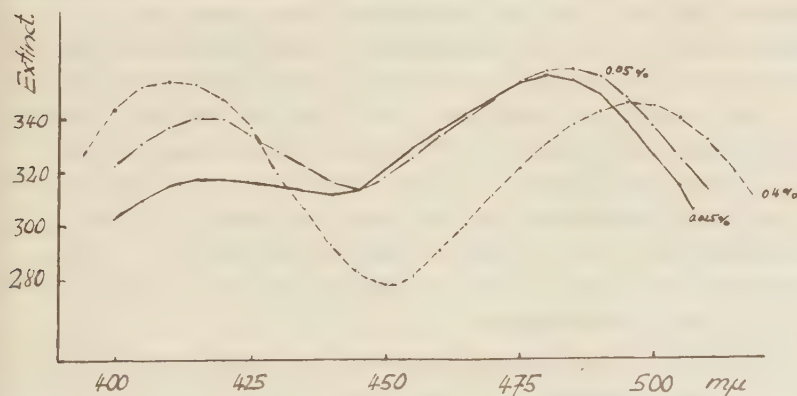


Abb. 11: Spektren der Gesamtfarbstoffe, die durch Umsetzung verschiedener Glycinmengen mit einer Lösung des gelben Farbstoffs entstanden.

Je weiter die Bindung der Aminosäure an das gelbe Pigment fortgeschritten ist, desto ausgeprägter ist sein erstes Maximum und desto weiter verschiebt sich dieses nach einer kürzeren Wellenlänge.

Kultiviert man *Penicillium funiculosum* auf Nährböden, die anstelle der Aminosäuren andere Stickstoffverbindungen

enthalten, so kann im Substrat nur gelber Farbstoff nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, daß dieser mit verschiedenen Purinen und Pyrimidinen keine Verbindung eingeht, obwohl sie - wie zum Beispiel Cytidin - eine Aminogruppe enthalten. Mit Nitrit und Harnstoff wird überhaupt kein Farbstoff gebildet.

Wurde die Stickstoffquelle ins Minimum gesetzt (die Versuchsansätze erhielten dabei pro 40 ml Substrat nur 0,25 mg Asparagin), so schied der Pilz trotz Anwesenheit von Phosphat gelben Farbstoff aus. In diesem Falle liegt der Grund der Farbstoffbildung also nicht im Phosphat- sondern im Stickstoffmangel.

f) Licht

Ebeling (1938) fand bei einem Stamm von *Penicillium funiculosum*, daß Licht die Farbstoffbildung fördert. In der Dunkelkammer wird nach seinen Ergebnissen die Ausbildung des Pigments um 10 - 12 Tage verzögert. Mit dem Münchener sowie mit einem Baarner Stamm durchgeführte Versuche lieferten jedoch entgegengesetzte Ergebnisse: Kulturen auf Czapek Agar, die sich im Dunkeln intensiv rot färben, bildeten bei Belichtung mit vier Leuchtstoffröhren (Osram HNT 40 W) in einer Entfernung von 50 cm überhaupt keinen roten Farbstoff aus. Auf flüssigen Nährböden wurde dagegen Pigment gebildet, der Beginn der Abscheidung erfolgte allerdings durchschnittlich 2 Tage später als in der Dunkelkammer.

Die Erklärung für diesen Unterschied liegt in der Lichtempfindlichkeit des gelben Farbstoffs: Belichtet man diesen in wässriger Lösung 20 Stunden mit der oben angegebenen Lichtintensität, so werden dadurch 30 % des Pigments zerstört; nach 90 Stunden Belichtung liegen nur noch 35 % unzersetzt vor. Der rote Farbstoff dagegen ist im Licht stabil. Auf festen Nährböden erfolgt die Verbindung des gelben Farbstoffs mit den Aminosäuren wahrscheinlich wegen Diffusionsschwierigkeiten wesentlich langsamer. Das gelbe Pigment ist deshalb bereits zerstört, bevor es sich in den im Licht stabileren roten Farbstoff umwandeln kann. Auf flüssigen Nährböden entgeht das Pigment durch die schnellere

Umwandlungsmöglichkeit der Zerstörung.

g) Farbstoffbildung in Stickstoffatmosphäre

Die Kultur des Pilzes in Stickstoffatmosphäre hatte eine deutliche Verringerung der Farbstoffbildung zur Folge. Als Versuchsgefäß diente ein Exsiccator, der nach dreimaliger Evakuierung durch eine Wasserstrahlpumpe mit Stickstoffgas gefüllt worden war. Vollkommen anaerobe Bedingungen durften allerdings nicht hergestellt werden, da sonst ein Wachstum des Pilzes ausblieb. Die Ergebnisse: Bei den Proben unter N_2 war der Beginn der Farbstoffbildung durchschnittlich um 4 Tage verzögert und die Farbstoffausbeute betrug nur 10 - 20 % der Sauerstoffproben.

Die Verringerung der Pigmentsynthese bei Sauerstoffentzug deutet darauf hin, daß an der Biosynthese des gelben Pigments Oxydationsvorgänge beteiligt sind.

h) Wirkung der Pigmente auf die Atmung von *Penicillium funiculosum*

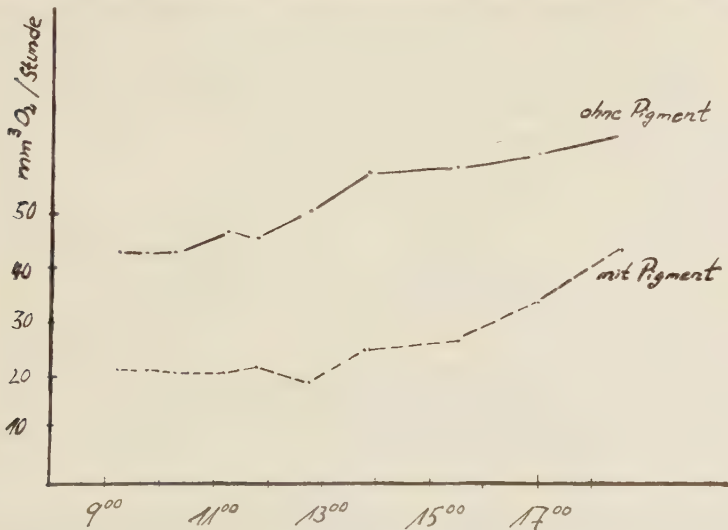


Abb. 12: Atmungshemmung nach Zugabe gelben Farbstoffs in folgende Nährlösung: 0,4 % Glukose, m/60 KH_2PO_4 , pH 4,7.

Zu einer unter optimalen Bedingungen gewachsenen Pilzsuspension

wurde einerseits gelbes, andererseits rotes Pigment in einer Konzentration zugegeben, wie sie normalerweise im Substrat vorliegt. Wie aus Abb. 12 zu ersehen ist, hemmt gelbes Pigment die Atmung in Gegenwart von Phosphat erheblich. Nach 6 Stunden beginnt jedoch wieder ein leichter Anstieg der Atmungsintensität, die sich dann nach weiteren 20 Stunden der der anderen Proben angleicht. Gleichzeitig mit der Atmungshemmung erfolgte eine Aufnahme des gelben Pigments in das Mycel und seine Umwandlung in die rote Form.

Im Gegensatz dazu wirkte der rote Farbstoff weder hemmend noch fördernd auf die Atmung. Da er nach Eintritt in das Mycel nicht sofort aus dem Diffusionsgleichgewicht entfernt wird, wie dies beim gelben der Fall ist, wird auch nur wenig aufgenommen.

i) Farbstoffbildung unter Einwirkung von Atmungsgiften

Durch Zugabe von Atmungsgiften zum Substrat sollte zweierlei versucht werden:

1. die Farbstoffbildung unter Bedingungen zu erzwingen, unter denen normalerweise kein Pigment ausgeschieden wird;
2. die Farbstoffbildung in einem Substrat, das normalerweise die Pigmentsynthese fördert, zu hemmen.

Die wirksamen Giftkonzentrationen wurden jeweils durch Atmungsmessungen im Warburgapparat ermittelt.

o-DNP		Azid		Monojodessigsäure	
m/10000	32 %	m/5000	39 %	m/5000	39 %
m/20000	44 %	m/10000	83 %	m/10000	60 %
m/40000	128 %	m/20000	84 %	m/20000	84 %

Arsenit		Fluorid	
m/80	9 %	m/80	3 %
m/160	78 %	m/160	26 %
m/320	121 %	m/320	60 %

Tab. 5: Atmungshemmung durch verschiedene Gifte; die Atmungsintensität ist in % der unvergifteten Glukoseatmung angegeben; als Substrat diente: 0,25 % Glukose, m/60 KH_2PO_4 , pH 4,7.

Penicillium funiculosum wurde auf Malzextraktnährböden kultiviert, gut ausgewaschen und zum einen Teil in eine Nährlösung gebracht, die Phosphat und Glukose enthielt, zum anderen Teil in ein Substrat, dem zusätzlich 0,4 % Asparagin zugesetzt war. In beiden Lösungen bildet der Pilz normalerweise keinen Farbstoff.

Vergiftung dieser Kulturen mit Monojodessigsäure und Azid in Konzentrationen von $m/2000$ - $m/10000$ bewirkte eine sehr deutliche Wachstumshemmung, rief jedoch keine Farbstoffbildung hervor. Das gleiche war der Fall mit O-DNP.

Bei Vergiftung mit Arsenit und Fluorid konnte jedoch, wie die Abb. 13 und 14 zeigen, Pigmentsynthese erzwungen werden.

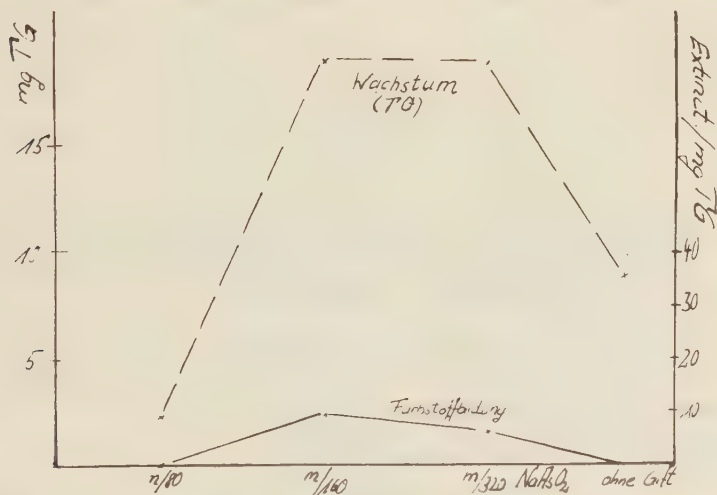


Abb. 13: Wirkung verschiedener Arsenitkonzentrationen auf Wachstum und Farbstoffbildung einer unter optimalen Bedingungen herangewachsenen Pilzsuspension; Substrat: 0,5 % Glukose, 0,4 % Asparagin, $m/600$ KH_2PO_4 , pH 4,7; — — — = Trockengewicht; — = Extinction bei 500 $\mu\mu$ /mg Trockengewicht.

Auffällig ist das bis um 150 % höhere Trockengewicht der vergifteten Proben. Das Optimum der Farbstoffbildung liegt bei Vergiftung mit Arsenit bei einer Konzentration von $m/160$, mit Fluorid bei $m/80$. Arsenit wirkt in einer Konzentration von $m/80$

deutlich wachstumshemmend, es wird dabei aber kein Pigment gebildet.



Abb. 14: Wachstum und Pigmentsynthese bei Vergiftung mit Fluorid; Bedingungen wie bei dem in Abb. 13 dargestellten Versuch; — = Trockengewicht; --- = Extinction des Nährbodens bei 500 μ /mg Trockengewicht.

Arsenat zwingt nur bei Abwesenheit von Phosphat im Medium zur Farbstoffbildung, da dieses durch das Gift nur dann im Organismus vollständig verdrängt werden kann.

Um die Hemmung der Pigmentsynthese auf einem phosphatfreien Nährboden, in dem normalerweise Farbstoff gebildet wird, zu untersuchen, wurden zu Kulturen von *Penicillium funiculosum*, die kurz vor der Farbstoffbildung standen, verschiedene Konzentrationen von Giften steril zugegeben. Dabei stellte es sich heraus, daß folgende Verbindungen in der angegebenen verdünnung die Farbstoffbildung verhinderten: o-DNP m/4000 - m/16000; Arsenit m/80 - m/320; Arsenat m/80 - m/320; Fluorid m/80 - m/320, Azid m/2000 - m/8000. Nur die mit Monojodessigsäure (m/5000 - m/10000) vergifteten Proben ließen normale Pigmentsynthese zu.

Es kann in diesem Falle jedoch nicht unterschieden werden, ob

es sich bei der Hemmung um eine spezifische Wirkung der Gifte auf die an der Farbstoffbildung beteiligten Enzyme handelt, oder ob es eine einfache Folge ihrer Toxizität ist. Die letztere Möglichkeit ist umso naheliegender, als der Stoffwechsel wegen des Phosphatmangels sowieso nur mühsam aufrechterhalten werden kann.

V. Farbstoffbildung unter dem Einfluß anderer Mikroorganismen

Es wurde beobachtet, daß auf Malzextraktnährböden - auf ihnen bildet der Pilz normalerweise keinen Farbstoff - Infektion mit anderen Mikroorganismen an den Stellen, an denen die beiden Kolonien aufeinandertrafen, eine intensive Rotfärbung jeweils unter der Infektionskultur auslöste. Es wurden daraufhin verschiedene Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit untersucht, Farbstoffbildung bei *Penicillium funiculosum* hervorzurufen. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Starke Pigmentbildung	schwache Pigmentbildung	keine Pigmentbildung
A. gigantes	A. ochraceus	A. sulphureus
A. fumigatus	F. culmorum	F. lycopersici
A. niger v. cruciata	P. capreolinum	P. purpurogen. var. rubrisklerotium
A. niger	P. luteum	P. camemberti
F. oxysporum	P. citrinum	P. roqueforti
F. aquaeductuum	P. notatum	P. claviforme
	P. crustaceum	P. brevicaulis
	Sacch. cerevisiae	P. digitatum
	" ellipsoideus	Rhodotorula gracilis
	" pastorianus	
	" turbidans	
	Strept. albus	
	" aureofaciens	
	" griseus	

Tab. 6: Farbstoffbildung unter der Einwirkung von Fremdorganismen; Abkürzungen: A. = *Aspergillus*, P. = *Penicillium*, Sacch. = *Saccharomyces*, Strept. = *Streptomyces*, F. = *Fusarium*.

Bakterien bewirken in keinem Fall eine Farbstoffbildung.

Bemerkenswert ist, daß *Rhodotorula* an den Stellen, an denen sie mit der Kultur von *Penicillium funiculosum* zusammentrifft, auch selbst keinen Farbstoff mehr entwickelt.

Streptomyces aureofaciens bildet um sich eine bis zu 10 mm breite Hemmzone aus, wobei roter Farbstoff jedoch nicht unter dem Streptomyceten, sondern am Rande der *Penicillium*-kultur auftritt. Dasselbe Ergebnis erhält man, wenn man Czapek Agar zuerst mit *Fusarium aquaeductuum*, nach drei Tagen jedoch mit Sporen von *Penicillium funiculosum* beimpft. Nach 14 Tagen zieht sich eine deutliche 12 mm breite Hemmzone um die *Fusarium*-kultur. In diesem Bereich war die Keimung der *Penicillium*-sporen gehemmt. Am Rande der *Penicillium*-kultur trat dabei verstärkte Farbstoffbildung auf (Abb. 15).

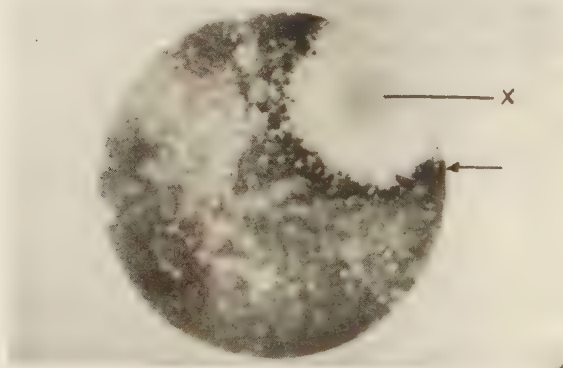


Abb. 15: Farbstoffbildung auf einer mit *Fusarium aquaeductuum* und *Penicillium funiculosum* beimpften Platte; x = *Fusarium*-kultur; ← = ringförmige Zone der Farbstoffbildung am Rande der *Penicillium*-kultur.

Die Farbstoffbildung kann demnach durch stofflichen Einfluß anderer Mikroorganismen erzwungen werden. Bei gleichzeitigem Impfen beider Pilze auf eine Platte bleibt die Hemmzonenbildung aus. Der rote Farbstoff tritt dann unter der *Fusarium*-kultur auf. Das Substrat erscheint nur leicht gelb gefärbt.

Die Bildung des roten Pigments erfolgt innerhalb der Hyphen von *Fusarium*.

Zur weiteren Untersuchung wurde folgender Versuch angesetzt: Eine Lösung gereinigten gelben Pigments wurde steril in ein ausgestanztes Agarloch neben einer Kultur von *Aspergillus niger* gegeben. Der Farbstoff diffundierte dabei ringsum in den Agar. Die Hyphen von *Aspergillus niger*, die in die Diffusionszone hineinwuchsen, färbten sich intensiv rot. Das mikroskopische Bild zeigte eine homogene Färbung des gesamten Plasmas. Daß es sich dabei nicht nur um eine Bindung des gelben Pigments an freie Aminosäuren, sondern auch an Eiweißmoleküle handelt, macht folgender Versuch wahrscheinlich: Dialysiertes Pferdserumglobulin wurde mit einer Lösung gelben Farbstoffs versetzt, wobei fast augenblicklich eine Reaktion stattfand, die auch hier zu einer tiefroten Anfärbung führte.

Streptomyces aureofaciens und *Streptomyces griseus* rufen an den Stellen, an denen sie mit Kolonien von *Penicillium funiculosum* zusammentreffen, in diesen Farbstoffbildung hervor. Da von beiden Streptomyceten bekannt ist, daß sie Antibiotika abscheiden, lag es nahe, die Ursache der Pigmentbildung in antibiotisch wirksamen Substanzen zu suchen.

Tetracyclin, Streptomycinsulfat und Penicillin G wurden in dieser Hinsicht geprüft.

Penicillin G ruft weder in Nährlösung (0,5 % Glukose, 0,4 % Asparagin, m/600 KH_2PO_4) noch auf festen Malzextraktnährböden im Mycel von *Penicillium funiculosum* Farbstoffbildung hervor. Dagegen erwiesen sich Tetracyclin und Streptomycinsulfat als wirksam: Beide induzieren Pigmentbildung in den auf Malzextrakt wachsenden Hyphen. Abb. 16 zeigt dies für Tetracyclin. Sobald das Mycel in die Diffusionszone des in ein ausgestanztes Agarloch eingefüllten Antibiotikums hineinwächst, wird in den Pilzhypen Farbstoff gebildet.

In der oben angegebenen Nährlösung wirkt jedoch nur Streptomycinsulfat, nicht dagegen Tetracyclin.

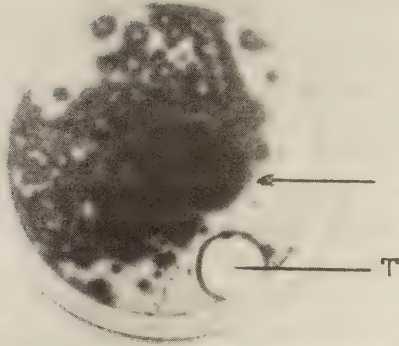


Abb. 16: Durch Tetracyclinzugabe (T) hervorgerufene Farbstoffbildung in den Hyphen von *Penicillium funiculosum* ←

Die Proben ohne Antibiotikum bleiben dabei vollkommen farblos, während bei Streptomycinsulfatzugabe von 0,5 mg/ml Substrat sich in der Nährlösung eine mittlere Extinction von 190 (bei 500 m μ) entwickelt.

VI. Farbstoffbildung bei anderen *Penicillium*arten

Verschiedene Arten der Gattung *Penicillium* wurden daraufhin untersucht, ob auch bei ihnen, ähnlich wie bei *Penicillium funiculosum*, Phosphatmangel die Pigmentbildung fördert. Hierzu wurden folgende Versuchsreihen angesetzt:

1. 0,5 % Glukose, 0,4 % Asparagin, jeweils zwei Kölbchen mit und zwei ohne m/600 KH₂PO₄;
2. 0,5 % Glukose, 0,4 % KNO₃, auch hier jeweils zwei Proben mit und zwei ohne Phosphat.

Nachstehende Pilzarten produzierten auf keinem der getesteten Nährböden Farbstoff: *Penicillium notatum*, *P. camemberti*, *P. digitatum*, *P. crustaceum*, *P. claviforme*, *P. brevicaulis*, *P. capreolium*, *P. rubrum*.

Bei *P. citrinum* und *P. luteum* waren die Ansätze mit Phosphat (sowohl bei Nitrat- als auch bei Asparaginzugabe) gelb gefärbt.

Wie ein Vergleich der Absorptionsspektren zeigte, waren diese Farbstoffe mit dem von *Penicillium funiculosum* ausgeschiedenen nicht identisch. Die Proben ohne Phosphat blieben farblos.

Nur *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium purpurogenum* var. *rubri-sklerotium* und verschiedene Stämme von *Penicillium funiculosum* zeigten mit dem Verhalten des von uns isolierten Stammes von *Penicillium funiculosum* bezüglich der Farbstoffbildung Übereinstimmung. Auf Nitratmedium entstand ein ausätherbarer gelber Farbstoff, auf Asparaginmedium ein rotes Pigment. Die Spektren stimmten mit denen der untersuchten Farbstoffe überein. Die Kulturen auf phosphathaltiger Nährlösung waren farblos bei *Penicillium funiculosum* und bei *Penicillium purpurogenum* var. *rubri-sklerotium*. *Penicillium purpurogenum* produzierte auf Asparaginmedium unter diesen Bedingungen keinen Farbstoff, schied jedoch auf Nitratnährböden rotes Pigment ins Substrat ab.

VII. Diskussion

Die Pigmentbildung findet bei *Penicillium funiculosum* nur unter Bedingungen statt, unter denen der Stoffwechsel des Pilzes gewisse Engpässe durchschreiten muß. So läßt sich die Farbstoffbildung einmal durch Phosphatmangel erzwingen, andererseits kann man aber auch bei Gegenwart von Phosphat die gleiche Wirkung durch Stickstoffmangel erzielen. Auch auf Substraten, die entweder keine oder nur schlecht verwertbare Kohlenhydrate enthalten, sonst aber optimale Zusammensetzung besitzen, scheidet der Pilz Farbstoff aus. Die Pigmentbildung ist also in allen diesen Fällen ein Ausdruck einer Mangelercheinung allgemeiner Art, da sie jeweils dann auftritt, wenn ein lebenswichtiger Stoff - Phosphat, Kohlenhydrat oder Stickstoff - ins Minimum gesetzt wird. Atmungsgifte wie Arsenat, das die Phosphorylierung blockiert, und Fluorid und Arsenit, die den vollkommenen Abbau von Kohlenhydraten verhindern, wirken im gleichen Sinn wie Phosphat- und Kohlenhydratmangel.

Ein für den Pilz ungünstiger pH-Wert fördert im Gegensatz dazu die Farbstoffbildung nicht. Maximale Pigmentsynthese erfolgt vielmehr bei der Wasserstoffionenkonzentration, bei der das Wachstumsoptimum des Pilzes liegt. Offenbar handelt es sich dabei um eine direkte pH-Abhängigkeit der Biosynthese. Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß der Farbstoff bei niedrigem pH-Wert relativ instabil ist. Man erhält deshalb im sauren Bereich unerwartet niedrige Werte.

Stets tritt bei *Penicillium funiculosum* als primäres Produkt der Farbstoffbildung zunächst das gelbe Pigment auf, das sich erst sekundär durch Komplexbildung in den roten Farbstoff umwandeln kann. Als Reaktionspartner können dabei sowohl die dem Substrat zugesetzten als auch die in der Zelle vorhandenen Aminosäuren dienen. Auch an das Plasma ist eine Bindung möglich. Offenbar handelt es sich dabei um keine vom Stoffwechsel des Pilzes gesteuerte Reaktion.

Allerdings hat die Konzentration der im Substrat vorliegenden Aminosäure einen Einfluß auf die Farbstoffabgabe. Dies läßt sich folgendermaßen erklären: Kann sich das gelbe Pigment aus irgend

einem Grund nicht in die rote Form umwandeln, dann häuft es sich im Mycel und im Substrat an und wirkt hemmend auf die weitere Synthese. Enthält das Substrat jedoch Aminosäuren, dann wird das Reaktionsgleichgewicht durch die Überführung des gelben Farbstoffs in das rote Pigment dauernd verschoben und damit ist der Weg für neue Farbstoffsynthese frei. Mit steigender Aminosäurenkonzentration wird die Geschwindigkeit der Umwandlungsreaktion entsprechend erhöht, ferner kann mehr gelber Farbstoff in den roten Komplex überführt werden.

Die Reaktion ist zugleich auch ein Entgiftungsvorgang, der allerdings vermutlich vom Pilz nicht aktiv kontrolliert wird. Durch Konzentrationen des gelben Farbstoffs, wie sie auch in vivo vorliegen, kann die Atmungsintensität eines unter optimalen Bedingungen herangewachsenen Mycels sehr stark gehemmt werden. Das rote Pigment zeigt diese Wirkung nicht. Hand in Hand mit dieser Atmungshemmung geht eine homogene Rotfärbung des gesamten Pilzplasmas, sodaß man annehmen kann, daß die beobachtete Atmungshemmung des Farbstoffs auf seiner Bindung an Zellproteine beruht. Die gleiche Wirkung übt das von *Penicillium funiculosum* gebildete gelbe Pigment auch auf andere Organismen aus, wie am Beispiel von *Aspergillus niger* untersucht wurde. Unter Rotfärbung des Mycels wird seine Atmungsintensität bis auf 30 - 40 % des Normalwertes herabgesetzt. Man kann in diesem Falle also von einem antibiotischen Effekt des gelben Farbstoffs sprechen.

Diese Ansicht wird noch durch die Tatsache bekräftigt, daß auf optimalen Nährböden wie Malzextraktagar die Farbstoffbildung nur dann auftritt, wenn die Kultur von *Penicillium funiculosum* auf eine Kolonie bestimmter Fremdorganismen wie *Aspergillus*- oder *Fusarium*arten trifft. Offenbar scheiden diese Pilze Stoffe in den Nährboden ab, die *Penicillium funiculosum* zur Farbstoffbildung veranlassen. Besonders deutlich ist dies bei Kulturen zu sehen, in denen beide Organismen noch durch eine Hemmzone getrennt sind. Es liegt dabei die Vermutung nahe, daß die antibiotische Substanz, die zur Hemmzonenbildung führt, in *Penicillium funiculosum* zugleich auch Farbstoffbildung auslöst. In der Tat schieden Reinkulturen des Pilzes unter dem Einfluß von Antibiotika wie Tetracyclin und Streptomycinsulfat Pigment ab.

Sind die Pilze nicht durch eine Hemmzone voneinander getrennt, dann erfolgt die Bildung des roten Pigments nicht in den Hyphen von *Penicillium funiculosum*, sondern in den Zellen des Fremdorganismus. *Penicillium funiculosum* kann also das gelbe Pigment in den Nährboden abgeben, ohne daß es sich vorher mit dem eigenen Plasma unter Rotfärbung verbindet und dieses dadurch schädigt.

Auf weniger optimalen Nährböden wie Czapek Agar (hier fehlen die Vitamine, Stickstoff liegt nur in Form von NO_3^- vor) kommt es auch in Reinkulturen von *Penicillium funiculosum* bereits zur Pigmentbildung. Sie wird wahrscheinlich durch giftige Stoffwechselprodukte veranlaßt, die im alternden Mycel entstehen; die Pigmentbildung beginnt nämlich erst am 7. - 9. Tag nach dem Beimpfen, und zwar jeweils im Zentrum der Pilzkultur. Der gelbe Farbstoff wird in diesem Falle nicht ins Substrat abgegeben, sondern reagiert mit dem Plasma der Zellen.

Nach Raistrick (1940) soll es eine Funktion vieler Pilzpigmente mit chinoider Struktur sein, Elektronen zu transportieren. Sollte diese Annahme auch für das gelbe Pigment von *Penicillium funiculosum* zutreffen, dann müßte es bereits in geringen Mengen stark atmungssteigernd wirken. Dies trifft jedoch nicht zu, sodaß man dem gelben Farbstoff eine solche Aufgabe nicht zuschreiben kann.

Abschließende Untersuchungen ergaben, daß *Penicillium purpurogenum* und *Penicillium purpurogenum* var. *rubri-sklerotium* ebenfalls gelben Farbstoff bilden, der sich mit Aminosäuren zum roten Pigment umsetzt. Die Umfärbung des gelben Pigments durch Bindung an Aminosäuren scheint also auch bei anderen Mikroorganismen vorzukommen.

VIII. Zusammenfassung

1. *Penicillium funiculosum* bildet unter Phosphat-, Stickstoff- oder Kohlenhydratmangel einen gelben Farbstoff.
2. Dieses gelbe Pigment kann sich mit Aminosäuren zu einem roten Komplex verbinden.
3. Optimale Farbstoffbildung erhält man im Dunkeln bei einer Temperatur von 20 - 22° C und einem pH von 5,0.
4. Die Pigmentsynthese ist unabhängig von der Art des zugegebenen verwertbaren Kohlenhydrats; stark fördernd wirkt dagegen eine Zugabe von 0,4 - 0,8 % Na-Glutaminat als Stickstoffquelle.
5. Die Farbstoffbildung wird durch hohe Aminosäurenkonzentrationen begünstigt.
6. In Stickstoffatmosphäre ist die Pigmentbildung gehemmt.
7. Arsenat, Fluorid und Arsenit rufen unter Bedingungen, in denen der Pilz normalerweise keinen Farbstoff bildet, Pigmentsynthese hervor.
8. Das gelbe Pigment hemmt im Gegensatz zum roten Komplex die Atmung von *Penicillium funiculosum* und auch die anderer Pilze sehr stark.
9. Farbstoffbildung kann in *Penicillium funiculosum* auch durch Stoffwechselprodukte anderer Mikroorganismen hervorgerufen werden. Als wirksam erwiesen sich Antibiotika wie Tetracyclin und Streptomycinsulfat.
10. *Penicillium purpurogenum* und *Penicillium purpurogenum* var. *rubri-sklerotium* bilden ebenfalls einen gelben Farbstoff, der sich mit Aminosäuren zum roten Komplex umsetzt.

IX. Literaturverzeichnis

- ABE, S. : Studies on the Classification of the Penicillia.
J. Gen. Appl. Microbiol. Vol 2, Nos 1-3, 1 - 344,
(1956)
- ABE, S. u. SAKAGUCHI, K.: Atlas of Micro-organisms: The
Penicillia, Tokio 1957
- ANSLOW, W. K. u. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry
of Micro-organisms. 57. Fumigatin and Spinulosin,
Metabolic Products of *Aspergillus fumigatus* Fres.
and *Penicillium spinulosum* Thom.
Biochem. J. 32, 687 - 696 (1938)
- ARNSTEIN, H. R. V., COOK, A. H. u. LACEY, M. S.: Production of
Antibiotics by Fungi: II. Production by *Fusarium javanicum*
and other *Fusaria*.
Brit. J. Exper. Path. 27, 349 - 355 (1946)
- ARNSTEIN, H. R. V., COOK, A. H. u. LACEY, M. S.: Production of
Antibiotics by Fungi: III. Javanicin.
J. Chem. Soc. Lond. 1021 - 1028 (1947)
- BIRKINSHAW, J. H.: Chemistry of the Fungi.
Ann. Rev. Biochem. 22, 371 - 398 (1953)
- " : Quinones as Metabolic Products of Micro-organisms.
Planta Medica 7, 367 - 382 (1959)
- BRENNER, W.: Die Farbstoffbildung bei *Penicillium purpurogenum*.
Svensk Bot. Tidskrift 12, 91 - 102 (1918)
- CLARKE, D. D. u. NORD, F. F.: Radicinin: A Metabolite from
Stemphylium radicinum. II. Chemistry and Action.
Arch. Biochem. Biophys. 59, 269 - 284 (1955)
- CURTIN, T., FITZGERALD, G. u. REILLY, J.: Die Produktion von
Phoenicin auf synthetischen Medien.
Biochem. J. 34, 1605 - 1610 (1940)
- EBELING, R.: Über den Einfluß von Licht auf die Farbstoffbil-
dung bei *Penicillium funiculosum* Thom.
Arch. Mikrobiol. 9, 1 - 19 (1938)
- FRIEDHEIM, E. A. H.: Sur la fonction respiratoire du pigment
rouge de *Penicillium phoeniceum*.
C. r. Soc. Biol. Paris 112, 1030 - 1032 (1932)
- " : Isolement du pigment rouge de *Penicillium phoeniceum*.
Helvet. chim. acta 21, 1464 - 1465 (1938)

- GALARRAGA, NEILL, K. G. u. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms: The colouring Matters of *Penicillium herquei*.
Biochem. J. 61, 456 - 464 (1955)
- GATENBECK, S.: On the Biosynthesis of the Pigments from *Penicillium islandicum*. I.
Acta chim. scand. 14, 102 - 106 (1960)
- " : On the Biosynthesis of the Pigments from *Penicillium islandicum*. II.
Acta chim. scand. 14, 296 - 302 (1960)
- " u. BARBESGARD, P.: On the Biosynthesis of the Pigments from *Penicillium islandicum*. III.
Acta chim. scand. 14, 230 - 231 (1960)
- HAYASHI, K., KIKUCHI, M. u. OKAMOTO, Y.: Studies on Pigment Formation in *Penicillium islandicum* Sopp. during Cultivation.
Bot. Mag. 72, No 851, 220 - 229 (1959)
- HIND, H. G.: The Colouring Matters of *Penicillium carminoviolaceum* Biourge, with a Note on the Production of Ergosterol by this Mould
Biochem. J. 34, 67 - 72 (1940)
- HIND, H. G.: The Constitution of Carviolin: A colouring Matter of *Penicillium carminoviolaceum*.
Biochem. J. 34, 577 - 579 (1940)
- HOWARD, B. H. a. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. 80. The Colouring Matters of *Penicillium islandicum* Sopp. Part 1. 1:4:5 Trihydroxy-2-methylanthraquinone.
Biochem. J. 44, 227 - 233 (1949)
- " a. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. 81. The Colouring Matters of *Pen. islandicum* Sopp. Part 2. Chrysophanic Acid.
Biochem. J. 46, 49 - 53 (1950)
- " a. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. 91. The Colouring Matters of *Pen. islandicum* Sopp. Part 3. Skyrin and Flavoskyrin.
Biochem. J. 56, 56 - 65 (1954)
- " a. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. 92. The Colouring Matters of *Pen. islandicum* Sopp. Part 4. Iridoskyrin, Rubroskyrin and Erythroskyrine.
Biochem. J. 57, 212 - 222 (1954)
- IGARASI, H.: The Metabolic Products of *Penicillium funiculosum*
J. Agr. chem. Soc. Japan 15, 225 (1939)

- KRAUSE u. ELLIS: A Study of the Growth of *Penicillium carminoviolaceum* in Media Containing Ethyl- and other Alcohols, with a Note on the Production of Pigment by this Mould.
Ann. Rev. Bot. 1, 499 - 513 (1937)
- MARTLAND, M. a. ROBISON, R.: Possible significance of hexose-phosphoric esters in ossification. Part VI. Phosphoric esters in bloodplasma.
Biochem. J. 20, 847 - 855 (1926)
- MICHALEK, H. a. SZARKOWSKA, L.: The Quinone- Amino Acid Complexes and Polyphenolase.
Acta Biochim. Polonica Vol VI, No 4, 399 - 409 (1959)
- MULL, R. P. a. NORD, F. F.: On the Mechanism of Enzyme Action. XXIII. Structure and Action of Rubrofusarin from *Fusarium graminearum* Schwabe (Fgra.) (*Gibberella saubinetii*).
Arch. Biochem. 4, 419 - 433 (1944)
- NEILL, K. G. a. RAISTRICK, H.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms: Metabolites of *Penicillium atrovenetum* Smith. Part 1. Atrovenetin: A New Crystalline Colouring Matter.
Biochem. J. 65, 166 - 176 (1957)
- POSTERNAK, T.: Sur la pigment de *Penicillium roseo-purpureum*.
Helvet. chim. acta 23, 1046 - 1053 (1940)
- " : Sur la constitution et la synthese de la phoenicine et sur quelques nouveaux dérivés de la 4,4'-ditoluoquinone.
Helvet. chim. acta 21, 1326 - 1351 (1938)
- RAISTRICK, H.: Biochemistry of the Lower Fungi
Ann. Rev. Biochem. 9, 571 - 592 (1940)
- " a. ZIFFER, J.: Studies in the Biochemistry of Micro-organisms: 84. The Colouring Matters of *Penicillium nalgiovensis* Laxa. Part 1. Nalgiovensin and Nalgio-laxin. Isolation, Derivatives and Partical Structures.
Biochem. J. 49, 563 - 574 (1951)
- RAPER, K. B., THOM, C. a. FENNELL, D. J.: A Manual of the *Penicillia*. 1949
- RIEDHART, J. M. a. PORTER, C. L.: Studies of a Unique Pigment Complex and Photobiological Reaction in *Pen. herquei*.
Mycologia 50, 390 - 402 (1958)
- ROBERTS, J. C. a. WARREN: Purpurogenone, a Metabolic Product of *Penicillium purpurogenum* Stoll.
J. Chem. Soc. (Lond.) 2992 - 2998 (1955)

- STODOLA, F. H., RAPER, K. B. a. FENNELL, D. J.: Pigments of *Penicillium herquei*.
Nature (Lond.) 167, 773 - 774 (1957)
- THOM, C.: The *Penicillia*, Baltimore 1930
- TIRUNARAYANAN, M. O. a. SIRSI, M.: Mode of Action of Javanicin, an Antibiotic from *Fusarium javanicum* Koorders.
Proceed. Sympos. Chemotherapy, 48 - 50 (1958)
- VIRTANEN: An Investigation Concerning the Relationship between the Production of Penicillin and Pigments of a *Penicillium* Strain.
Suomen K. Ser. B. 22, 12 - 14 (1949)

L e b e n s l a u f

Am 23. April 1937 wurde ich, August Böck, als Sohn des Brauers Ulrich Böck und seiner Frau Therese, geb. Fichtl, in Kaltenberg im Landkreis Landsberg am Lech geboren. Ich besuchte von 1944 - 1948 die Volksschule in Geltendorf und trat dann am 1. September 1948 in die Oberrealschule Augsburg ein, die ich im Juli 1957 mit der Reifeprüfung abschloß. Im Wintersemester 1957/58 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. Seit dem Wintersemester 1959/60 arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Brauner an meiner Dissertation.

